

## **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА В ЦЕЛЯХ АНТИДОПИНГОВОГО КОНТРОЛЯ**

**И.О. Зверева<sup>1, @</sup>, научный сотрудник отдела пептидного допинга и анализа крови, Н.Б. Савельева<sup>1</sup>, старший научный сотрудник отдела пептидного допинга и анализа крови, П.В. Постников<sup>1</sup>, заместитель начальника отдела пептидного допинга и анализа крови, Ю.А. Ефимова<sup>2</sup>, доцент, М.А. Дикунец<sup>1</sup>, директор**

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Антидопинговый Центр», Москва, 105005 Россия

<sup>2</sup>Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий), Москва, 119571 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: zvereva@dopingtest.ru

*В статье представлены результаты работы, являющейся одним из этапов разработки методики количественного определения хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) методом сверхвысокопроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС/МС) для выявления случаев его злоупотребления в качестве допинга спортсменами. В ходе работы идентифицированы триптические пептиды, соответствующие наиболее распространенным изоформам ХГЧ:  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицам, расщепленному и коровому фрагменту  $\beta$ -субъединицы гормона. Идентификация и секвенирование специфических фрагментов выполнены методом наноВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения с использованием высокоточного и чувствительного масс-спектрометра гибридного типа. Проведена оптимизация масс-спектрометрического определения выбранных специфических пептидов методом СВЭЖХ-МС/МС. Количественное определение ХГЧ по специфическим фрагментам методом СВЭЖХ-МС/МС позволяет однозначно детектировать соответствующие изоформы, что значительно повышает специфичность метода и снижает вероятность получения ложноположительного результата.*

**Ключевые слова:** хорионический гонадотропин, ХГЧ, изоформы, трипсинолиз, сверхпроизводительная ВЭЖХ, масс-спектрометрия, антидопинговый контроль.

## **APPROACHES TO CHORIONIC GONADOTROPIN QUANTITATIVE DETERMINATION IN ANTI-DOPING CONTROL**

**I.O. Zvereva<sup>1, @</sup>, N.B. Savelieva<sup>1</sup>, P.V. Postnikov<sup>1</sup>, Yu.A. Efimova<sup>2</sup>,  
M.A. Dikunets<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution "Antidoping Centre", Moscow, 105005 Russia

<sup>2</sup>Moscow Technological University (Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

@Corresponding author e-mail: zvereva@dopingtest.ru

*The article presents the results of the first stage of development of a new quantitative method for human chorionic gonadotropin (hCG) determination by means of ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to uncover doping abuse by athletes. The identified tryptic peptides correspond to the most abundant hCG isoforms: the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits, the nicked and  $\beta$ -core fragment of the hormone. Identification and sequencing of specific fragments were performed with the use of nanoLC-MS/MS. A high resolution / high accuracy hybrid mass-spectrometer was applied. Optimization of mass-spectrometric*

*determination of selected specific peptides was accomplished by UPLC-MS/MS. Quantitative evaluation of hCG using specific fragments determination by UPLC-MS/MS allows to detect corresponding hCG isoforms. This significantly increases the method specificity and decreases the probability of false-positive results.*

**Keywords:** human chorionic gonadotropin, hCG, isoforms, trypsinolysis, ultra-HPLC, mass-spectrometry, anti-doping control.

## Введение

В последнее время возрастает интерес к различным соединениям пептидной природы с потенциальным допинговым эффектом, обладающим по сравнению с низкомолекулярными допинговыми субстанциями рядом преимуществ, среди которых быстрая деградация исходных соединений в организме человека. Это делает их особенно привлекательными для использования спортсменами. В частности, с введением нового класса «Пептидные гормоны и аналоги» в качестве допинговых агентов, Международный Олимпийский комитет (МОК) обратил внимание на один из стимуляторов эндогенной секреции гормонов – хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) [1]. ХГЧ способствует секреции тестостерона, являющегося одним из наиболее популярных допинговых агентов среди атлетов, злоупотребление которым выявляется с использованием высокочувствительных методов газовой хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС) или изотопной масс-спектрометрией [2–4].

ХГЧ вместе с гипофизарными фолликулостимулирующим (ФСГ) и лютеинизирующим (ЛГ) гормонами принадлежат к семейству гонадотропных гормонов (гонадотропинов), представляющих собой подкласс тропных гормонов. В то же время, гонадотропины с гипофизарным тиреотропным гормоном (ТТГ) и недавно открытым тиреостимулином образуют семейство гликопротеиновых гормонов (ГПП). Все члены этого семейства по своей структуре являются гетеродимерами и состоят из гликозилированных  $\alpha$ -субъединицы ( $\alpha$ ГПП) и  $\beta$ -субъединицы ( $\beta$ ГПП), нековалентно связанных между собой.  $\alpha$ -Субъединица идентична для всех гонадотропинов, в то время как химические структуры  $\beta$ -субъединиц каждого из гонадотропинов уникальны. ХГЧ синтезируется в больших концентрациях у женщин при беременности клетками плаценты, в малых концентрациях – гипофизом и рядом других тканей при различных опухолях. Большая часть циркулирующего ХГЧ подвергается метаболической деградации с образованием нескольких различных изоформ: свободной  $\beta$ -субъединицы ( $\beta$ ХГЧ), как минимум двух изоформ расщепленных  $\beta$ -субъединиц и корового фрагмента  $\beta$ ХГЧ (кф $\beta$ ХГЧ). Присутствие определенных изоформ в организме человека используется в качестве маркера при диагностике раковых заболеваний [5, 6].

В настоящее время применение ХГЧ спортсменами мужского пола строго регулируется классом S2 «Пептидные гормоны, факторы роста, подобные им субстанции и миметики» Запрещенного списка ВАДА [7]. Согласно рекомендациям ВАДА, антидопинговые лаборатории должны выполнять первичный скрининговый тест иммуноферментными методами анализа (ИФА) с использованием коммерчески доступных наборов, оценивающих содержание интактного ХГЧ ( $u$ -ХГЧ) в биопробах спортсменов. Пробы мочи с концентрацией  $u$ -ХГЧ более 5 МЕ/л считаются положительными и должны быть проанализированы подтверждающим методом, оценивающим концентрацию только интактной изоформы [8]. Однако, в зависимости от используемых антител, методы ИФА не всегда обладают достаточной селективностью из-за кросс-реактивности с продуктами деградации  $u$ -ХГЧ, что может приводить к увеличению вероятности вынесения ложноположительного результата [3]. Одним из альтернативных подходов, характеризующихся высокой селективностью и чувствительностью, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

В настоящей работе представлены результаты исследований, являющихся одним из этапов разработки методики количественного определения ХГЧ в образцах мочи спортсменов методом сверхвысокопроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС/МС). Ввиду идентичности  $\alpha$ -субъединиц гонадотропинов и большого разнообразия изоформ ХГЧ, в основе методики лежит принцип подхода «Bottom-Up», при котором производится количественное определение специфического пептида анализируемого соединения, полученного в процессе протеолитического гидролиза. Выбор оптимального специфического пептида и применение методов tandemной масс-спектрометрии позволят значительно увеличить специфичность детекции и снизить вероятность получения ложноположительного результата.

## Экспериментальная часть

### Материалы

В качестве стандартов использовали международные эталонные препараты изоформ ХГЧ,

приобретенные у Национального Института биологических стандартов и контролей (NIBSC, Великобритания) (табл. 1).

**Таблица 1.** Каталожные номера соединений, используемых в исследовании изоформ ХГЧ

| Стандарт                               | Каталожный номер NIBSC |
|--|------------------------|
| <i>u</i> -ХГЧ                          | 99/688                 |
| кф/ <i>β</i> ХГЧ                       | 99/708                 |
| <i>α</i> -Субъединица ХГЧ              | 99/720                 |
| <i>β</i> -Субъединица ХГЧ              | 99/650                 |
| <i>β</i> -Субъединица ХГЧ расщепленная | 99/692                 |
| Расщепленный ХГЧ                       | 99/642                 |

Все растворы готовили с использованием деионизированной воды, с удельным сопротивлением 18.2 мОм/см, приготовленной с помощью системы водоподготовки Milli-Q Integral-5 (Millipore, Франция). L-Дитиотреитол, бычий сывороточный альбумин были предоставлены Sigma-Aldrich (США), гидрокарбонат аммония – AppliChem (Германия), йодацетамид – Acros Organic (США), фосфатно-солевой буфер – Amresco (Канада), трипсин пригодной для секвенирования степени чистоты – Promega (США). Подвижные фазы для хроматографического разделения готовили с использованием воды фирмы Biosolve (Франция), ацетонитрила и метанола – Merck (Германия), все растворители марки «для хроматографии». Муравьиная кислота с чистотой >98% предоставлена Fluka (Швейцария), трифторуксусная кислота с чистотой 99.5% – Acros Organic (США).

## Методы

### Приготовление растворов стандартов

Навески стандартов растворяли в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина, до конечной концентрации 2 МЕ/мкл, аликвотировали и хранили при -80°C.

### Получение триптических фрагментов изоформ ХГЧ

К аликвотам концентрированных растворов, содержащих 100 МЕ каждой из изоформ ХГЧ, добавляли по 100 мкл 0.1 М буферного раствора гидрокарбоната аммония (рН 7.4), тщательно перемешивали. Дисульфидные связи восстанавливали добавлением 5 мкл 1 М раствора L-дитиотреитола с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37°C и постоянном встряхивании (600 об./мин). Сульфгидрильные группы алкилировали добавлением йодацетамида до конечной концентрации реагента 20 мМ с последующей инкубацией при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Трипсинолиз осуществляли в течение ночи при добавлении 1 мкг трипсина в каждый

образец. Процесс протеолитического расщепления терминировали добавлением муравьиной кислоты до конечной концентрации в растворе 1%. Полученные образцы центрифугировали при 14000 об./мин и анализировали хромато-масс-спектрометрическими методами.

### Проведение анализа с помощью нано-ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения (наноВЭЖХ-МСВР)

Для идентификации триптических фрагментов применяли нанопотоковый хроматограф модели Dionex Ultimate 3000 LS Nano и масс-спектрометр высокого разрешения гибридного типа Q Exactive с ионной ловушкой и возможностью эффективного выбора ионов-прекурсоров фирмы Thermo Scientific, Германия. Концентрирование наносимого образца проводили на предколонке Acclaim Pep Map 100 (75 мкм × 2 см, размер частиц 3 мкм, Thermo Finnigan, Германия). Хроматографическое разделение компонентов осуществляли с использованием аналитической колонки Zorbax 300 SB-C18 (75 мкм × 150 мм, размер частиц 3.5 мкм, Agilent, США). Загрузочный буферный раствор вода/ацетонитрил/муравьиная кислота/трифторуксусная кислота 98/2/0.1/0.08 (об./об./об./об.) использовали в качестве элюента загрузочного насоса для нанесения образца на концентрирующую предколонку. Элюирование на концентрирующую колонку проводили по программе: 0–5 мин – 100% загрузочного буферного раствора при скорости потока 3 мкл/мин. Водный раствор 0.1% муравьиной кислоты (А) и 0.1% раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил/вода 80/20 (об./об.) (В) использовали в качестве подвижных фаз. Разделение компонентов смеси проводили градиентным элюированием по программе: 0–5 мин – 5% (В); 35–40 мин – 95% (В); 41–48 мин – 5% (В); скорость потока – 350 нл/мин; температура термостата колонок – 25°C; объем пробы – 1 мкл. Детектирование триптических фрагментов проводили в режиме положительной ионизации с использованием стального эмиттера от Thermo, Германия.

Параметры масс-спектрометра: напряжение на эмиттере – 2.2 кВ, температура внутреннего капилляра – 275°C, максимальное время инъекции ионов – 100 мс, окно изоляции ионов – 2.0 а.е.м., скорость сканирования – 1 скан/с. Анализ проб осуществляли в двух режимах сканирования: сканирование по полному ионному току с разрешением 70000 в диапазоне масс *m/z* 50–2100 и мониторинг селективных ионов с окном изоляции 1.5 Да с разрешением 35000 и последующей фрагментацией иона-прекурсора каждого анализируемого соединения. Энергия соударения составляла 20 и 25 эВ, допустимая ошибка массы детектированных фрагментов – не более 5 млн<sup>-1</sup>. Обработку полученных данных производили с помощью программного обеспечения Xcalibur



версии 2.2. Точные массы одно- и многозарядных ионов-прекурсоров триптических пептидов, а также точные массы их ионов-продуктов рассчитывали с помощью интернет-ресурса Mass Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>).

**Проведение анализа с помощью сверхвысокопроизводительной высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (СВЭЖХ-МС/МС)**

СВЭЖХ-МС/МС-анализ триптических фрагментов проводили на жидкостном хроматографе модели Ultimate 3000 LS, соединенного с квадрупольным масс-анализатором Quantiva фирмы Thermo Finnigan, Германия, оснащенного внешним источником нагреваемой электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении. Хроматографическое разделение компонентов осуществляли с использованием аналогичной аналитической колонки Zorbax 300 SB-C18 (1×50 мм, размер частиц 3.5 мкм, Agilent, США) с предколонкой Zorbax Stablebond (1×17 мм, размер частиц 5 мкм, Agilent, США). В качестве элюентов использовали 0.1% растворы муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитриле (В). Градиентное элюирование проводили по программе: 0 мин – 5% (В); 15 мин – 37% (В); 16-18 мин – 95% (В); 18-18.5 мин – 5% (В), скорость потока – 150 мкл/мин, температура термостата колонок – 25°C; объем пробы – 3 мкл.

Параметры масс-спектрометра: температура внутреннего капилляра – 275°C, температура источника электрораспылительной ионизации – 325°C, напряжение на распылителе – 1.5 кВ, максимальное время накопления ионов – 30 мс, разрешение квадрупольных Q1 и Q2 на ширине половины высоты максимума – 2.0. Соединения детектировали в режиме мониторинга селективных реакций.

### Результаты и их обсуждение

Согласно новым требованиям ВАДА, при подтверждающем анализе антидопинговые лаборатории должны проводить количественное определение интактного хорионического гонадотропина человека (*u*-ХГЧ) с использованием тестового набора ИФА другого производителя или хромато-масс-спектрометрическими методами [7]. При разработке, валидации и внедрении методики количественного определения ХГЧ в пробах спортсменов ВЭЖХ-МС/МС-методом ВАДА рекомендует обращаться к статье [14], в которой приведено описание пробоподготовки, позволяющей отделить интересующую изоформу *u*-ХГЧ от других. Пробоподготовка заключается в двухэтапной иммуноферментной очистке образцов мочи с использованием различных типов антител, иммобилизованных на магнитных частицах, с последующим протеолитическим расщеплением анализируемых

соединений. На первом этапе используются антители, специфичные к эпитопам  $\beta$ -субъединицы и ее коровому фрагменту, но не к *u*-ХГЧ. С помощью таких антител, конъюгированных к магнитным частицам, и магнитного штатива данные изоформы удаляются из образца мочи или сыворотки крови. На втором этапе к образцам добавляются антители, специфичные к *u*-ХГЧ, в результате чего происходит его выделение из образца.

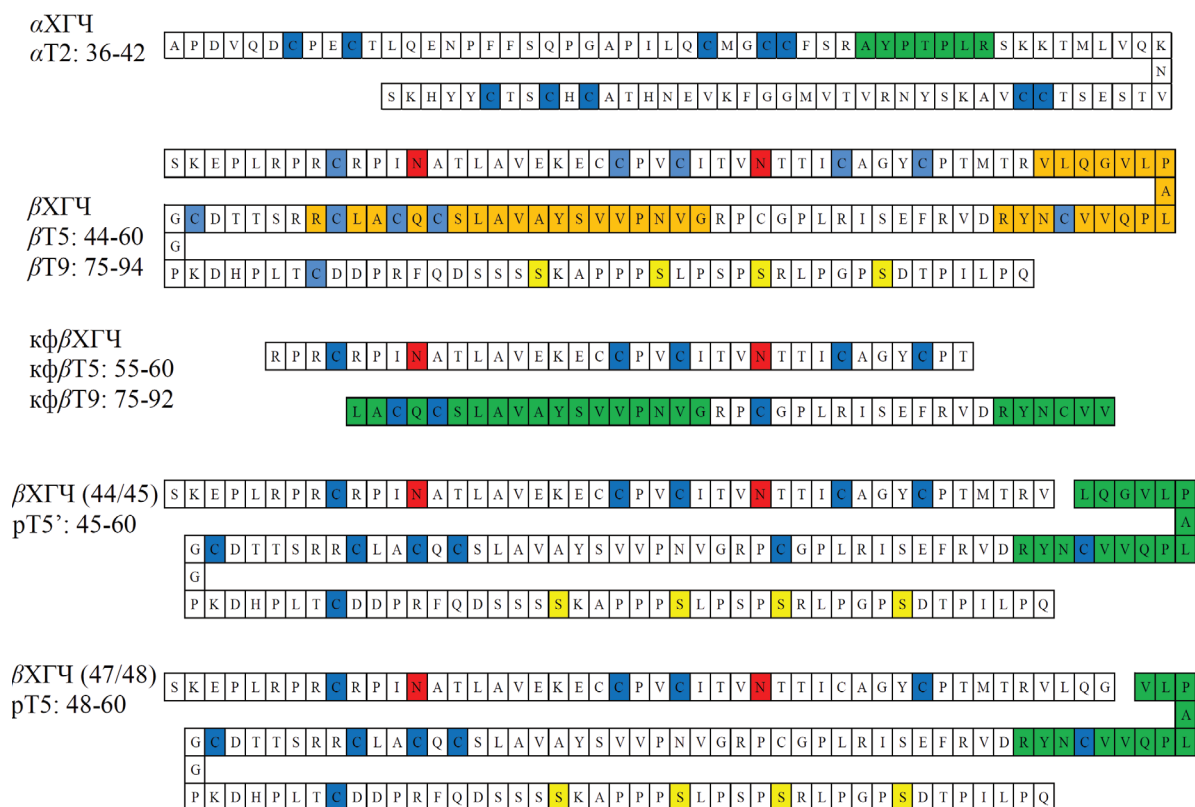
Масс-спектрометрический анализ заключается в одновременном качественном и количественном анализе изоформ ХГЧ по их специфическим фрагментам, образующимся в результате протеолитического гидролиза. Данный принцип применялся ранее при разработке методик количественного определения ХГЧ, как для использования в клинической диагностике, так и в целях допинг-контроля [9–13]. Специфические фрагменты изоформ ХГЧ получают в процессе протеолитического расщепления с использованием трипсина, который с высокой специфичностью осуществляет гидролиз пептидных связей белковой цепи после аминокислотных остатков лизина и аргинина. Образовавшиеся триптические фрагменты могут использоваться в качестве специфических пептидов для количественного определения изоформ ХГЧ. Ниже предложены триптические пептиды различных изоформ ХГЧ, которые могут использоваться в качестве специфических фрагментов (рис. 1).

#### *$\alpha$ -Субъединица*

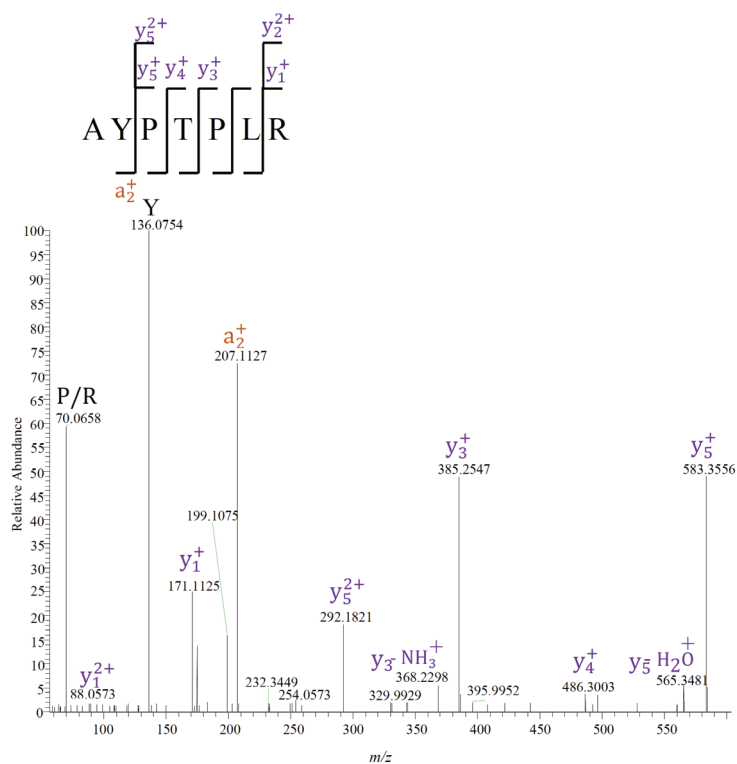
Количественная оценка свободной  $\alpha$ -субъединицы ХГЧ в биологических образцах не имеет практической ценности с точки зрения антидопингового контроля ввиду неэквивалентного соотношения  $\alpha/\beta$ -субъединиц ХГЧ при синтезе в нормальных физиологических условиях и их идентичности для всех гонадотропинов. Однако при использовании данной схемы иммуноочистки перед финальным этапом пробоподготовки в анализируемом образце остается только *u*-ХГЧ, состоящий из обеих субъединиц. Таким образом, определение  $\alpha$ -субъединицы позволит использовать ее в качестве маркера успешной пробоподготовки и для количественной оценки *u*-ХГЧ при использовании соответствующего изотопно-меченого внутреннего стандарта.

При анализе концентрата после трипсинолиза методом наноВЭЖХ-МС/МС нами идентифицирован триптический фрагмент  $\alpha$ T2, соответствующий критериям, выдвигаемым при выборе оптимального пептида [11]. На рис. 2 представлен масс-спектр двухзарядного иона-прекурсора специфического пептида.

Фрагментарные ионы с  $m/z$  207.11, 385.25, 583.35, соответствующие  $a_2^+$ ,  $y_3^+$  и  $y_5^+$ , являются самыми интенсивными при данных условиях анализа и могут использоваться для количественного опреде-



**Рис. 1.** Схематическое изображение аминокислотных последовательностей различных изоформ ХГЧ с указанием предлагаемых специфических пептидов (выделены цветом; также отмечены остатки цистеина (C), участвующие в образовании дисульфидных связей, и остатки аспарагина (N) и серина (S), по которым происходит соответственно *N*- и *O*-гликозилирование).



**Рис. 2.** Масс-спектр двухзарядного иона-прекурсора специфического пептида  $\alpha$ T2 с  $m/z$  409.2314, полученный методом наноВЭЖХ-МС/МС в режиме tSIM-tMSMS, энергия коллизии 25 эВ.

ления ХГЧ при выполнении подтверждающего анализа. Специфичность выбранных ионов-прекурсоров и ионов-продуктов была показана путем анализа шести образцов концентрата, полученных в результате протеолитического расщепления трипсином, без добавления стандарта  $\alpha$ -субъединицы.

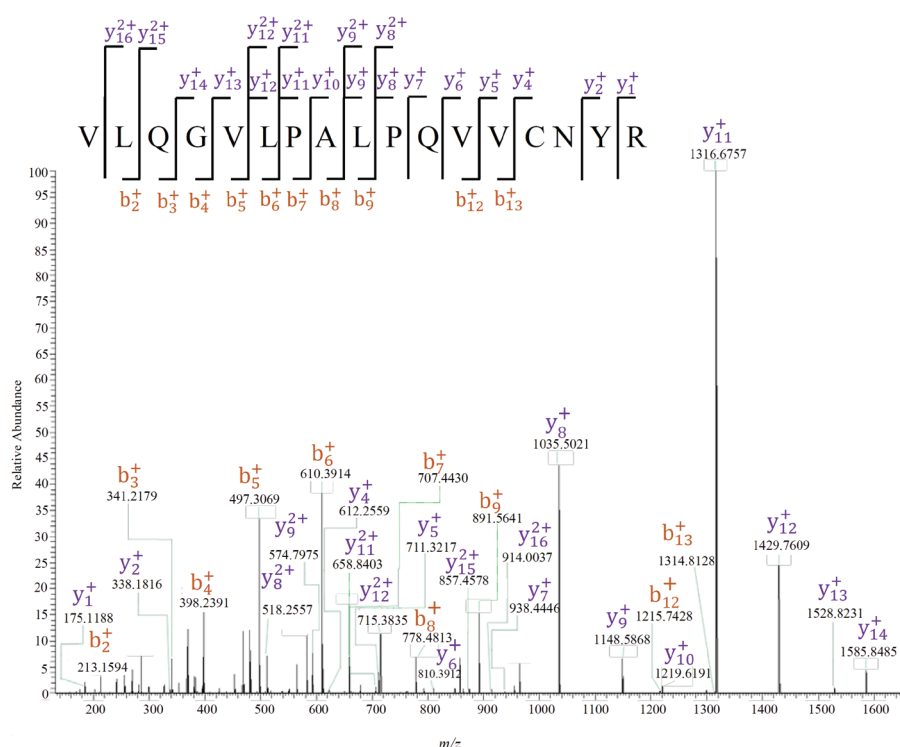
### $\beta$ -Субъединица

В отличие от  $\alpha$ -субъединицы, химические структуры  $\beta$ -субъединиц каждого из гонадотропинов уникальны. Наибольшая гомология аминокислотных последовательностей наблюдается среди ЛГ и ХГЧ и составляет примерно 80%, степень родства ХГЧ с двумя другими гормонами – ФСГ и ТТГ ниже.

$\beta$ -Субъединица ХГЧ состоит из 145 аминокислотных остатков и включает уникальную аминокислотную последовательность  $\beta$ 121–145, называемую С-концевым пептидом. Кроме различий в аминокислотных последовательностях гонадотропинов, у гормонов значительно отличаются углеводные части. Если  $\alpha$ -субъединица содержит два олигосахаридных остатка, что характерно для всех гонадотропинов, то  $\beta$ -субъединицы ЛГ, ФСГ и ХГЧ включают один, четыре и шесть олигосахаридных остатков, соответственно. В структуре  $\beta$ -субъединицы ХГЧ аминокислотные остатки аспарагина в положениях 13, 30 и аминокислотные остатки серина в положениях 121, 125, 132, 138 гликозилированы углеводными цепями биантенной и моноантенной структуры, соот-

ветственно. Таким образом, четыре из шести сайтов гликозилирования  $\beta$ -субъединицы ХГЧ локализованы на С-концевом пептиде, что обеспечивает биологическую специфичность всего гетеродимера.

При анализе аминокислотной последовательности  $\beta$ ХГЧ триптические пептиды, образуемые из области С-концевого пептида, являются наиболее уникальными, однако каждый из них содержит сайт гликозилирования. При ферментативной деградации молекулы могут образовываться триптические фрагменты с гетерогенным составом углеводной части, что может отрицательно сказаться на результатах анализа. Другими потенциальными триптическими фрагментами, соответствующими критериям [11], являются пептиды  $\beta$ T5 и  $\beta$ T9. В результате анализа методом наноВЭЖХ-МС/ВР показано, что наиболее оптимальным специфическим пептидом является  $\beta$ T5 ввиду его более интенсивной ионизации по сравнению с  $\beta$ T9. Триптический пептид  $\beta$ T5 состоит из 17 аминокислотных остатков, одним из которых является химически нестабильная аминокислота цистеин. Стандартным подходом при анализе цистеин-содержащих белков и пептидов является алкилирование сульфгидрильных групп винилпиридином или йодацетамидом [9–14]. В состав  $\beta$ T5 также входит аминокислота глутамин с дополнительной ионогенной группой, в результате чего при ионизации пептида образуются двух- и трехзарядные ионы-прекурсоры. На рис. 3 представлен масс-спектр двухзарядного иона-прекурсора специфического пептида  $\beta$ T5.



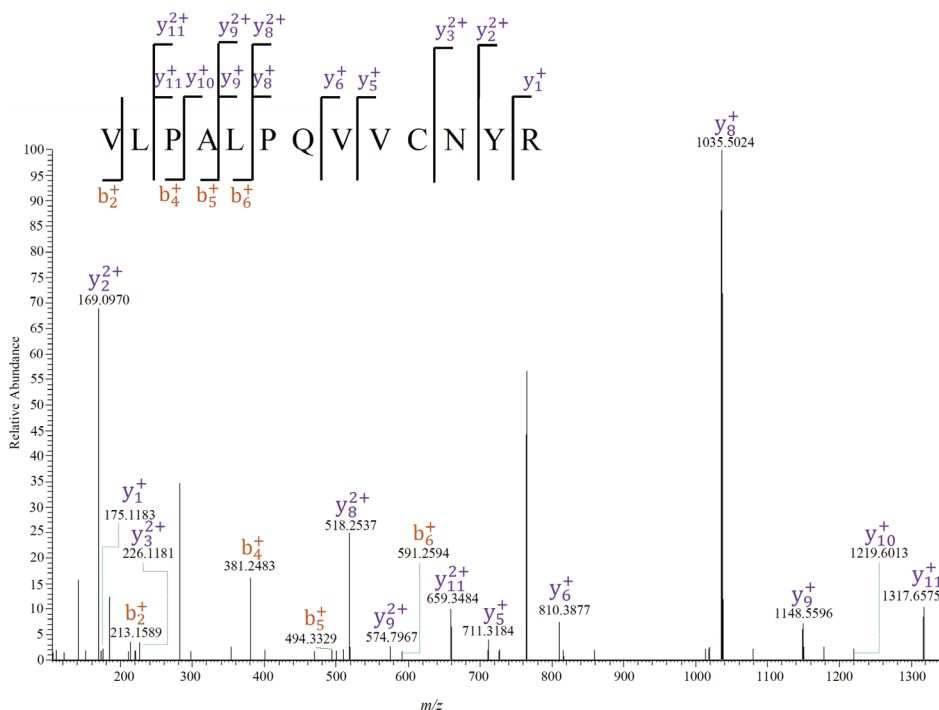
**Рис. 3.** Масс-спектр двухзарядного иона-прекурсора специфического пептида  $\beta$ T5 с  $m/z$  964.0365, полученный методом наноВЭЖХ-МС/ВР в режиме tSIM-tMSMS, энергия коллизии 25 эВ.

Фрагментарные ионы с  $m/z$  1316.67, 1035.50, 610.39, соответствующие  $y_{11}^+$ ,  $y_8^+$  и  $b_6^+$ , являются наиболее интенсивными при данных условиях анализа и могут использоваться для количественного определения ХГЧ при проведении подтверждающего анализа. Высокая специфичность и характеристичность выбранных ионов-продуктов была доказана анализом шести образцов концентрата без добавления стандарта  $\beta$ ХГЧ, полученных в результате трипсинолиза.

#### Расщепленные изоформы ХГЧ (44/45 и 47/48)

Расщепленные изоформы  $\beta$ ХГЧ (44/45) и  $\beta$ ХГЧ

(47/48) являются промежуточными продуктами деградации ХГЧ, образованными при расщеплении пептидной связи в положениях 44/45 и 47/48, соответственно. Данные разрывы полипептидной цепи располагаются в последовательности пептида  $\beta$ T5, поэтому эти триптические фрагменты нами предложены в качестве специфических пептидов расщепленных изоформ для количественного определения ХГЧ. На рис. 4-5 представлены масс-спектры двухзарядных ионов-прекурсоров специфических пептидов рТ5 и рТ5'  $\beta$ ХГЧ (47/48) и  $\beta$ ХГЧ (45/46), соответственно.



**Рис. 4.** Масс-спектр двухзарядного иона-прекурсора специфического пептида рТ5  $\beta$ ХГЧ (47/48) с  $m/z$  765.4235, полученный методом наноВЭЖХ-МС/МС в режиме tSIM-tMSMS, энергия коллизии 25 эВ.

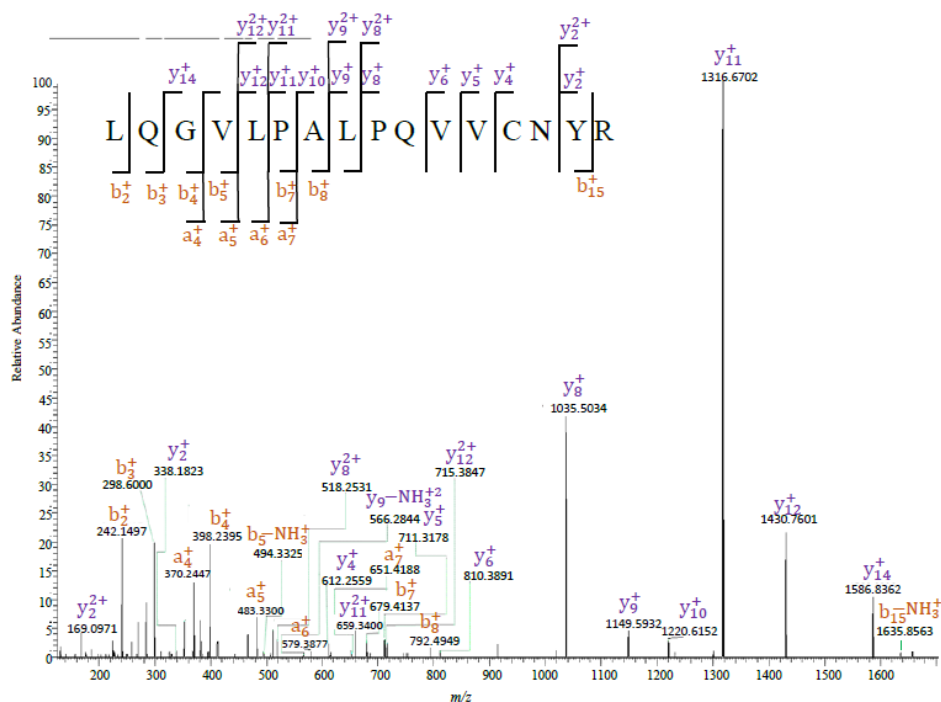
Поскольку  $\beta$ 1-антитела также специфичны к расщепленной изоформе ХГЧ, фрагментарные ионы с  $m/z$  1035.50, 810.38, 1317.65, соответствующие  $y_8^+$ ,  $y_6^+$  и  $y_{11}^+$ , предложено использовать для качественной оценки эффективности проведенной пробоподготовки образцов мочи при выполнении подтверждающего анализа с целью количественного определения  $u$ -ХГЧ.

Фрагментарные ионы с  $m/z$  1316.67 и 1035.50, соответствующие  $y_{11}^+$  и  $y_8^+$ , являются наиболее интенсивными в данных условиях, однако часто они дополнительно протонируются (рис. 5). Изменение молекулярной массы образуемых ионов-продуктов может отрицательно сказаться на стабильности определения соединений, поэтому в качестве ионов-продуктов данного специфического пептида предложено детектировать ионы с  $m/z$  398.23, 518.25 и 715.38, соответствующие  $b_4^+$ ,  $y_8^{2+}$  и  $y_{12}^{2+}$ . Анализом шести образцов концентрата без добавления стандарта после

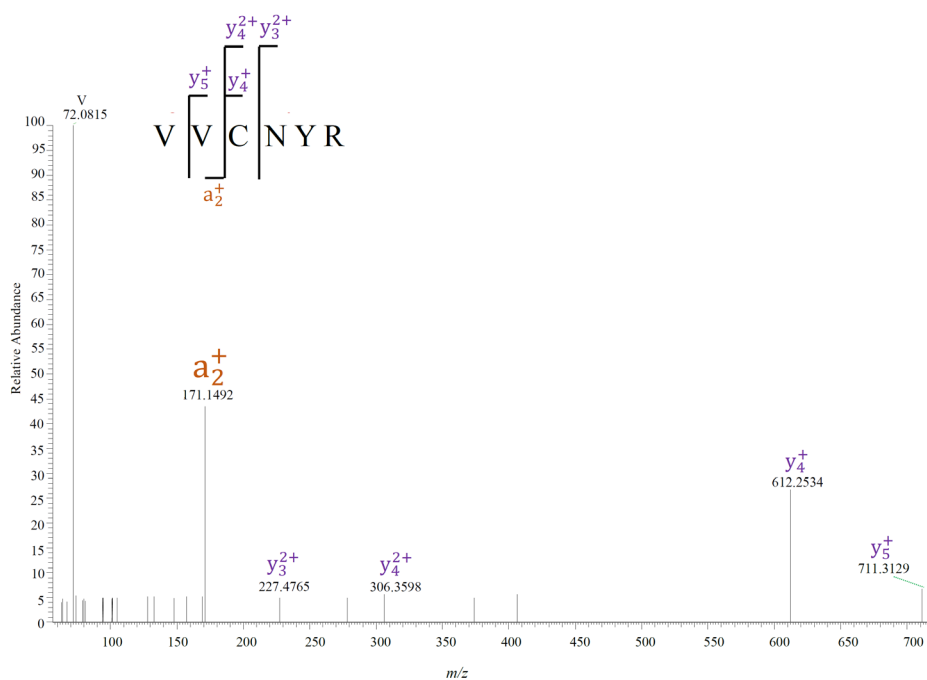
трипсинолиза доказана специфичность выбранных ионов для  $\beta$ ХГЧ (44/45) и  $\beta$ ХГЧ (47/48).

#### кф $\beta$ ХГЧ

Коровый фрагмент  $\beta$ -субъединицы ХГЧ (кф $\beta$ ХГЧ) является конечным продуктом деградации ХГЧ и представляет собой два фрагмента аминокислотной последовательности  $\beta$ -субъединицы ХГЧ, состоящих из аминокислот  $\beta$ 6-40 и  $\beta$ 55-92, стабилизированных четырьмя дисульфидными связями [5]. Согласно данным работ [15–17], не менее 50% общего количества ХГЧ деградирует до структуры корового фрагмента в процессе почечной экскреции, что важно учитывать при оптимизации методики пробоподготовки. В работах [9, 14] в качестве специфических пептидов предлагается детектировать  $\beta$ T9 и  $\beta$ T5, отличающиеся на 2 и 12 аминокислотных остатков, соответственно. Поскольку для количественной оценки  $u$ -ХГЧ предложено использовать  $\beta$ T5, в качестве



**Рис. 5.** Масс-спектр двухзарядного иона-прекурсора специфического пептида рТ5'  $\beta$ ХГЧ (44/45) с  $m/z$  914.4996, полученный методом наноВЭЖХ-МС/МС в режиме tSIM-tMSMS, энергия коллизии 20 эВ.



**Рис. 6.** Масс-спектр двухзарядного иона-прекурсора специфического пептида кф $\beta$ Т5 с  $m/z$  405.6991, полученный методом наноВЭЖХ-МС/МС в режиме tSIM-tMSMS, энергия коллизии 25 эВ.

специфического пептида выбран кф $\beta$ Т5, масс-спектр которого представлен на рис. 6.

Фрагментарные ионы с  $m/z$  612.25, 711.31, 171.14, соответствующие  $y_4^+$ ,  $y_5^+$  и  $a_2^+$ , являются наиболее интенсивными и могут использоваться для количественного определения ХГЧ. Их специфичность

была доказана анализом шести концентратов, полученных в результате протеолитического расщепления трипсином, без добавления стандарта кф $\beta$ ХГЧ.

#### **Оптимизация СВЭЖХ-МС/МС-параметров**

Далее нами проведена оптимизация хромато-масс-спектрометрического определения выбранных



триптических фрагментов  $\alpha$ T2,  $\beta$ T5, кф $\beta$ T5, pT5  $\beta$ XГЧ (47/48) и pT5'  $\beta$ XГЧ (44/45) в условиях tandemной масс-спектрометрии, которая является наиболее популярной для количественной оценки белков и пептидов в протеомных исследованиях [18]. Характеристичность и специфичность выбранных переходов ион-прекурсор/ион-продукт доказана

анализом шести модельных образцов мочи, в которые добавили и-XГЧ до конечной концентрации 5 МЕ/мл, и шести образцов без добавления стандарта в качестве бланковых образцов после пробоподготовки. В табл. 2 приведены основные хромато-масс-спектрометрические параметры детектируемых соединений.

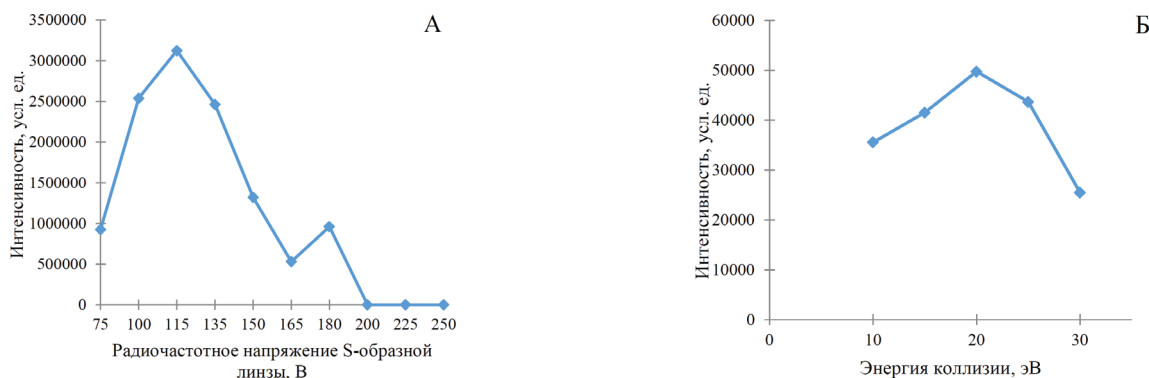
**Таблица 2.** Основные параметры СВЭЖХ-МС/МС-анализа при количественном определении ХГЧ в моче спортсменов

| Специфический пептид     | Время удерживания, мин | Ион              |   | Напряжение, подаваемое на S-линзу, В | Энергия коллизии, эВ |
|--------------------------|------------------------|------------------|---|--------------------------------------|----------------------|
|                          |                        | прекурсор, $m/z$ | продукт, $m/z$  |                                      |                      |
| $\alpha$ T2              | 5.06                   | 409.5            | 292.3 ( $y_5^{2+}$ )<br>487.6 ( $y_4^+$ )<br>207.2 ( $a_2^+$ )                        | 75                                   | 20<br>30<br>20       |
| $\beta$ T5               | 10.35                  | 643.5            | 518.9 ( $y_8^{2+}$ )<br>612.2 ( $y_4^+$ )<br>711.7 ( $y_5^+$ )<br>811.0 ( $y_6^+$ )   | 115                                  | 15<br>20<br>20<br>20 |
| pT5 $\beta$ XГЧ (47/48)  | 8.60                   | 510.6            | 282.2 ( $a_3^+$ )<br>352.9 ( $a_4^+$ )<br>810.3 ( $y_6^+$ )<br>1036.2 ( $y_8^+$ )     | 75                                   | 20                   |
| pT5' $\beta$ XГЧ (44/45) | 9.80                   | 914.6            | 299.2 ( $b_3^+$ )<br>398.4 ( $b_4^+$ )<br>1316.7 ( $y_{11}^+$ )<br>1036.7 ( $y_8^+$ ) | 135                                  | 30                   |
| кф $\beta$ T5            | 1.51                   | 406.0            | 612.2 ( $y_4^+$ )<br>711.6 ( $y_5^+$ )  | 115                                  | 15                   |

Ввиду отсутствия референсных стандартов анализируемых специфических фрагментов, оптимизацию значений радиочастотного напряжения, подаваемого на S-образную линзу, и энергии соударения в ячейке столкновений проводили в ручном режиме. Как видно на примере перехода  $m/z$  643.5  $\rightarrow$  612.2 специфического пептида  $\beta$ T5 на рис. 7, графики зависимости, полученные при оптимизации данных параметров, имеют вид полиномиальной кривой с

максимумами в широких диапазонах напряжения на линзе (75–150 В) и энергии соударения (10–25 эВ). Аналогичные графики зависимостей были получены для всех анализируемых специфических пептидов.

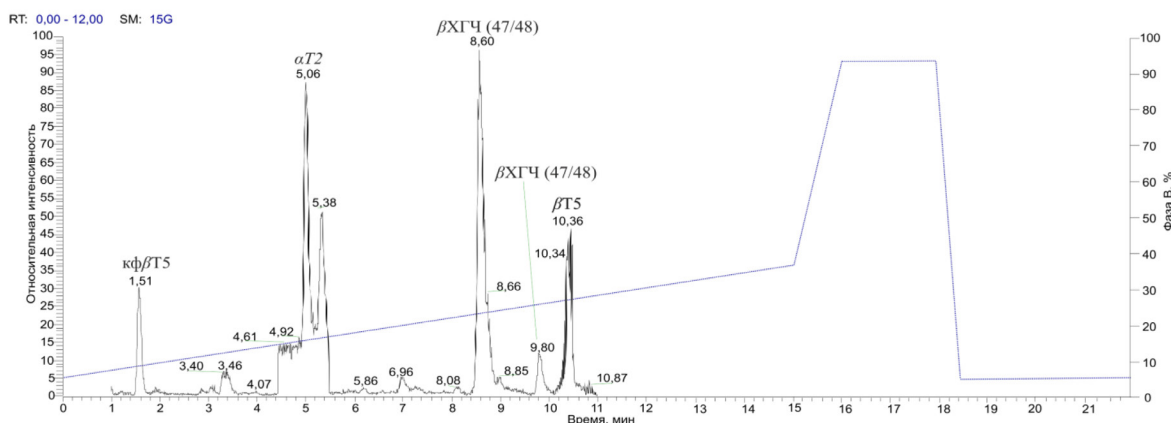
Пределы количественного определения специфических пептидов различных изоформ ХГЧ рассчитывали на основании данных сертификатов стандартов и составили 0.25 пмоль/л для  $\alpha$ T2,  $\beta$ T5 и 0.5 пмоль/л – для кф $\beta$ T5, pT5  $\beta$ XГЧ (47/48) и pT5'  $\beta$ XГЧ (44/45), соответственно.



**Рис. 7.** Влияние радиочастотного напряжения S-образной линзы на интенсивность иона-прекурсора специфического пептида  $\beta$ T5 с  $m/z$  643.5 (А) и энергии соударения в камере столкновений на интенсивность образующегося иона-продукта с  $m/z$  612.2 (Б).

Использование небольшой скорости нарастания градиента органического растворителя в мобильной фазе позволило лучше разделять анализируемые пептиды (рис. 8). Для улучшения формы пиков подобрана оптимальная скорость потока мобильных фаз. Как видно из хроматограммы определяемых специфических пептидов, хроматографические пики всех веществ симметричны и имеют форму распределения Гаусса. Ширина пиков анализируемых пептидов составляет 0.2-0.6 мин.

Таким образом, использование метода СВЭЖХ-МС/МС позволяет сократить время анализа с 48 до 22 мин, что обеспечивает сравнительно большую производительность. Детектирование специфических пептидов изоформ ХГЧ тройным квадрупольным масс-спектрометром позволяет реализовать возможность анализа в режиме регистрации заданных процессов фрагментации, называемого мониторингом выбранных/селективных реакций (МВР). Данный режим детектирования соединений наибо-



**Рис. 8.** Хроматограмма раствора изоформ ХГЧ (2.5 пмоль/л  $\alpha$ -ХГЧ и 5.0 пмоль/л кф $\beta$ ХГЧ) и расщепленного ХГЧ после протеолитического гидролиза трипсином методом СВЭЖХ-МС/МС. Показан профиль содержания ацетонитрила в подвижной фазе (обозначен синим контуром).

лее часто используется в количественных методиках определения как низкомолекулярных, так и соединений пептидной природы.

### Выводы

В ходе проделанной работы подобраны оптимальные специфические пептиды, соответствующие свободным  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицам и наиболее распространенным изоформам ХГЧ. Специфические пептиды  $\alpha$ Т2,  $\beta$ Т5, кф $\beta$ Т5, рТ5  $\beta$ ХГЧ (47/48) и рТ5'  $\beta$ ХГЧ (44/45) позволяют однозначно идентифицировать соответствующие изоформы ХГЧ, что способствует увеличению специфичности разрабатываемой методики и позволяет отслеживать эффективность пробоподготовки образцов. Данное исследование выпол-

нено с использованием двух систем: наноВЭЖХ-МСВР для подтверждения структуры выбранных триптических фрагментов и СВЭЖХ-МС/МС. В ходе выполнения работы выбраны и оптимизированы фрагментные ионы каждого из специфических пептидов, которые были включены в методику количественного определения ХГЧ в пробах мочи спортсменов.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства спорта Российской Федерации в рамках государственного контракта № 397 от 14.07.2016 г. «Разработка методики количественного определения хорионического гонадотропина человека в целях антидопингового контроля с помощью методов СВЭЖХ-МС/МС».

### References:

### Список литературы:

1. Kicman A.T., Brooks R.V., Cowan D.A. Human chorionic gonadotrophin and sport // Br. J. Sports Med. 1991. V. 25. № 2. P. 73–80.
2. 2014 Anti-Doping Testing Figures Report. [Электронный ресурс] – Режим доступа: [https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada\\_2014\\_anti-doping-testing-figures\\_full-report\\_en.pdf](https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada_2014_anti-doping-testing-figures_full-report_en.pdf) (дата обращения 25.08.2016).
3. 2013 Anti-Doping Testing Figures Report. [Электронный ресурс] – Режим доступа: [https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada\\_2013\\_anti-doping-testing-figures\\_full-report\\_en.pdf](https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada_2013_anti-doping-testing-figures_full-report_en.pdf) (дата обращения 25.08.2016).

1. Kicman A.T., Brooks R.V., Cowan D.A. Human chorionic gonadotrophin and sport // Br. J. Sports Med. 1991. V. 25. № 2. P. 73–80.
2. 2014 Anti-Doping Testing Figures Report. [Электронный ресурс] – Access mode: [https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada\\_2014\\_anti-doping-testing-figures\\_full-report\\_en.pdf](https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada_2014_anti-doping-testing-figures_full-report_en.pdf) (date of access 25.08.2016).
3. 2013 Anti-Doping Testing Figures Report. [Electronic resource] – Access mode: [https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada\\_2013\\_anti-doping-testing-figures\\_full-report\\_en.pdf](https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada_2013_anti-doping-testing-figures_full-report_en.pdf) (date of access 25.08.2016).

wada-main-prod.s3.amazonaws.com/wada\_2013\_anti-doping\_testing\_figures\_report\_en.pdf (дата обращения 25.08.2016).

4. 2012 Anti-Doping Testing Figures Report. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-2012-Anti-Doping-Testing-Figures-Report-EN.pdf> (дата обращения 25.08.2016).

5. Цырлина Е.В., Порошина Т.Е. Хорионический гонадотропин как маркер трофобластической болезни // Практическая онкология. 2008. Т. 9. № 3. С. 150–159.

6. Bogerd J. Ligand-selective determinants in gonadotropin receptors // Mol. Cell Endocrinol. 2007. V. 2. № 260-262. P. 144–152.

7. The 2016 Prohibited list. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list> (дата обращения 25.08.2016).

8. Guidelines reporting & management of urinary human chorionic gonadotrophin (hCG) and luteinizing hormone (LH) findings in male athletes. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-guidelines-hcg-lh-findings-v2.0-2015-en.pdf> (дата обращения 25.08.2016).

9. Lund H., Lovsletten K., Paus E., Halvorsen T.G., Reubsæet L. Immuno-MS based targeted proteomics: highly specific, sensitive, and reproducible human chorionic gonadotropin determination for clinical diagnostics and doping analysis // Anal. Chem. 2012. V. 84. № 18. P. 7926–7932.

10. Liu C.-L., Bowers L.D. Immunoaffinity trapping of urinary human chorionic gonadotropin and its high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric confirmation // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 1996. V. 687. P. 213–220.

11. Gam L.H. Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles / Ed. J. Prasain. Croatia: InTech, 2012. 788 p.

12. Gam L.H., Tham S.-Y., Latiff A. Immunoaffinity extraction and tandem mass spectrometric analysis of human chorionic gonadotropin in doping analysis // J. Chromatogr. B. 2003. V. 792. № 2. P. 187–196.

13. Lund H., Torsetnes S.B., Paus E., Nustad K., Reubsæet L., Halvorsen T.G. Exploring the complementary selectivity of immunocapture and MS detection for the differentiation between hCG isoforms in clinically relevant samples // J. Proteome Res. 2009. V. 8. № 11. P. 5241–5252.

14. Woldemariam G.A., Butch A.W. Immunoextraction-tandem mass spectrometry method for measuring intact human chorionic gonadotropin, free  $\beta$ -subunit, and  $\beta$ -subunit core fragment in urine // Clin. Chem. 2014. V. 60. № 8. P. 1089–1097.

main-prod.s3.amazonaws.com/wada\_2013\_anti-doping\_testing\_figures\_report\_en.pdf (date of access 25.08.2016).

4. 2012 Anti-Doping Testing Figures Report. [Electronic resource] – Access mode: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-2012-Anti-Doping-Testing-Figures-Report-EN.pdf> (date of access 25.08.2016).

5. Tsyrlina E.V., Poroshina T.E. Human chorionic gonadotropin as a marker of trophoblastic diseases // Prakticheskaya onkologiya (Practical Oncology). 2008. V. 9. № 3. P. 150–159. (in Russ.).

6. Bogerd J. Ligand-selective determinants in gonadotropin receptors // Mol. Cell Endocrinol. 2007. V. 2. № 260-262. P. 144–152.

7. The 2016 Prohibited list. [Electronic resource] – Access mode: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list> (date of access 25.08.2016).

8. Guidelines reporting & management of urinary human chorionic gonadotrophin (hCG) and luteinizing hormone (LH) findings in male athletes. [Electronic resource] – Access mode: <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/wada-guidelines-hcg-lh-findings-v2.0-2015-en.pdf> (date of access 25.08.2016).

9. Lund H., Lovsletten K., Paus E., Halvorsen T.G., Reubsæet L. Immuno-MS based targeted proteomics: highly specific, sensitive, and reproducible human chorionic gonadotropin determination for clinical diagnostics and doping analysis // Anal. Chem. 2012. V. 84. № 18. P. 7926–7932.

10. Liu C.-L., Bowers L.D. Immunoaffinity trapping of urinary human chorionic gonadotropin and its high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric confirmation // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 1996. V. 687. P. 213–220.

11. Gam L.H. Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles / Ed. J. Prasain. Croatia: InTech, 2012. 788 p.

12. Gam L.H., Tham S.-Y., Latiff A. Immunoaffinity extraction and tandem mass spectrometric analysis of human chorionic gonadotropin in doping analysis // J. Chromatogr. B. 2003. V. 792. № 2. P. 187–196.

13. Lund H., Torsetnes S.B., Paus E., Nustad K., Reubsæet L., Halvorsen T.G. Exploring the complementary selectivity of immunocapture and MS detection for the differentiation between hCG isoforms in clinically relevant samples // J. Proteome Res. 2009. V. 8. № 11. P. 5241–5252.

14. Woldemariam G.A., Butch A.W. Immunoextraction-tandem mass spectrometry method for measuring intact human chorionic gonadotropin, free  $\beta$ -subunit, and  $\beta$ -subunit core fragment in urine // Clin. Chem. 2014. V. 60. № 8. P. 1089–1097.

15. Stenman U.H., Hotakainen K., Alfthan H. Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use // *Br. J. Pharmacol.* 2008. V. 154. P. 569–583.

16. Alfthan H., Haglund C., Dabek J., Stenman U.H. Concentrations of human choriogonadotropin, its beta-subunit, and the core fragment of the beta-subunit in serum and urine of men and nonpregnant women // *Clin. Chem.* 1992. V. 38. № 10. P. 1981–1987.

17. Grenache D.G., Greene D.N., Dighe A.S., Fantz C.R., Hoefner D., McCudden C., Sokoll L., Wiley C.L., Gronowski A.M. Decreased Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Results Due to Increased Concentrations of the Free  $\beta$  Subunit and the  $\beta$  Core Fragment in Quantitative hCG Assays // *Clin. Chem.* 2010. V. 56. № 12. P. 1839–1844.

18. Pan S., Aebersold R., Chen R., Goodlett D.R., McIntosh M.W., Zhang J., Brentnall T.A. Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. № 2. P. 287–297.

15. Stenman U.H., Hotakainen K., Alfthan H. Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use // *Br. J. Pharmacol.* 2008. V. 154. P. 569–583.

16. Alfthan H., Haglund C., Dabek J., Stenman U.H. Concentrations of human choriogonadotropin, its beta-subunit, and the core fragment of the beta-subunit in serum and urine of men and nonpregnant women // *Clin. Chem.* 1992. V. 38. № 10. P. 1981–1987.

17. Grenache D.G., Greene D.N., Dighe A.S., Fantz C.R., Hoefner D., McCudden C., Sokoll L., Wiley C.L., Gronowski A.M. Falsely Decreased Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Results Due to Increased Concentrations of the Free  $\beta$  Subunit and the  $\beta$  Core Fragment in Quantitative hCG Assays // *Clin. Chem.* 2010. V. 56. № 12. P. 1839–1844.

18. Pan S., Aebersold R., Chen R., Goodlett D.R., McIntosh M.W., Zhang J., Brentnall T.A. Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. № 2. P. 287–297.